User Guide





JBS Kit d'initiation à la cristallisation des protéines

Cat. No.	Amount
CS-401FR	1 Kit

seulement pour utilisation *in vitro*
garantie de qualité pendant 12 mois
entreposer à 4 °C

Introduction

Il existe principalement deux méthodes pour déterminer la structure tridimensionnelle d'une protéine: la Résonance Magnétique Nucléaire (RMN) et la cristallographie aux rayons X.

La RMN permet de déterminer la structure atomique de protéines qui reste relativement petites, ayant un poids moléculaire en dessous de 50 000 Dalton environ, soit moins de 440 acides amines. La cristallographie aux rayons X est plus appropriée pour déterminer la structure de protéines ou de complexes macromoléculaires de taille plus importante. L'analyse des structures de la myoglobine (1950) et de l'hémoglobine (1955) par cristallographie aux rayons X ont été récompenses par le prix Nobel de la Chimie en 1962. Cette récompense souligna l'importance de la cristallographie aux rayons X et marqua l'émergence de la biologie structurale comme voie importante de recherche en sciences de la vie.

Le premier pas vers la détermination d'une structure par cristallographie aux rayons X, souvent le plus difficile, est l'obtention de cristaux de bonne qualité. Un cristal est une structure tridimensionnelle formée par une disposition régulière d'un certain nombre d'éléments de base. Comment peut-on obtenir des cristaux à partir de molécules aussi complexes que les protéines?

Pour arriver à une structure cristalline à partir de protéines dissoutes dans de l'eau, il faut réduire leur solubilité. En règle générale, la réduction de la solubilité entraîne la formation d'un précipité amorphe. Cependant, en sélectionnant des conditions spécifiques pour que les surfaces complémentaires de protéines adjacentes se trouvent face à face, des interactions attractives peuvent avoir lieu. Si ces interactions sont géométriquement favorables, elles peuvent donner lieu à la cristallisation.

La cristallisation est une transition de phase ; la molécule passe d'une phase liquide à une phase solide, le cristal. Le comportement d'une molécule en fonction des variations de son environnement peut être décrit sous la forme d'un diagramme de phases (fig.1). La courbe de solubilité définie la limite entre phase soluble et phase solide. Au niveau de la courbe, états soluble et solide sont en équilibre dynamique. Pour qu'une macromolécule cristallise, elle doit dépasser cette courbe et entrer dans une zone hors équilibre thermodynamique. Elle se trouve alors dans un état de sursaturation qui lui permet d'initier sa cristallisation.

Cette initiation ou nucléation, ne s'opère que si la sursaturation est suffisante. Il existe, de ce fait, une seconde courbe, dite courbe de super-solubilité, qui sépare deux zones sursaturées du diagramme : la zone de nucléation ou zone labile, où la sursaturation élevée conduit à la nucléation du cristal et la zone métastable où la sursaturation plus faible est juste suffisante pour qu'un cristal existe et croisse.

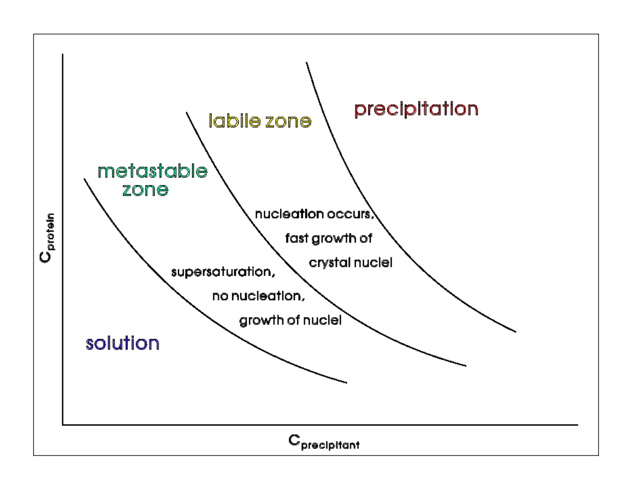


Fig. 1: Représentation schématique d'un diagramme de phase

Pour atteindre une solution super-saturée on fait varier les concentrations en protéine et/ou en précipitant dans le schéma du diagramme de phases (Fig. 1). Les mécanismes physiques responsables du changement de concentration peuvent être la diffusion liquide-liquide dans le cas de la méthode « en batch » ou la





diffusion de vapeur dans le cas de la méthode de la « goutte pendante ». La méthode de diffusion de vapeur est actuellement la plus utilisée pour la cristallisation des protéines.

Le procédé expérimental de la méthode de la « goutte pendante » est illustré dans la Figure 2. Une goutte (1 à 5 microlitre habituellement) d'un mélange de la protéine et d'agent précipitant est placé sur la face inférieure d'une lamelle au-dessus d'un réservoir (environ 1 ml) contenant une solution dont la concentration en précipitant est supérieure mais ne contenant pas de protéine. L'enceinte est hermétiquement scellée. L'équilibration se fait par évaporation des composés volatils (l'eau, par exemple) de la goutte vers le réservoir, jusqu'à ce que les tensions de vapeur à la surface des deux compartiments soit identiques.

Cela va entraîner une augmentation de la concentration de la protéine et de précipitant dans la goutte. Si des conditions appropriées ont été choisies, cela va amener la protéine à cristalliser.

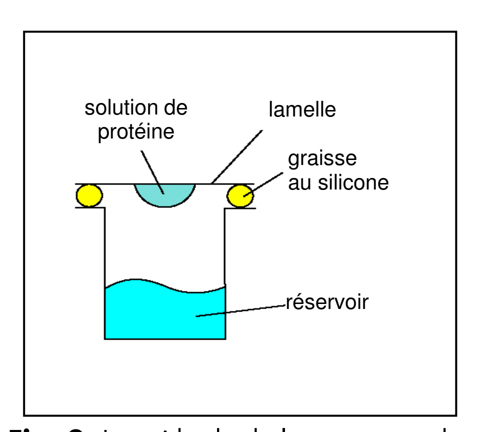


Fig. 2: La méthode de la goutte pendante

Quelles substances utilise-t-on comme précipitant ?

En principe toutes les substances qui peuvent influencer la solubilité de la protéine sont susceptibles d'être utilisés comme précipitants, pour autant qu'une concentration élevée de précipitant n'entraîne pas la dénaturation de la protéine.

Généralement on classe les différents précipitants utilisés pour la cristallisation des protéines selon leur effet en solution. Les précipitants les plus utilisés incluent les sels, les polymères organiques, les alcools, et parfois l'eau pure.

Des sels comme le $(NH_4)_2SO_4$, le NaCl, le LiCl, le KH_2PO_4, etc modifient la force ionique de la solution. La variation de la solubilité d'une protéine en fonction de la force ionique est représentée dans la Figure 3.

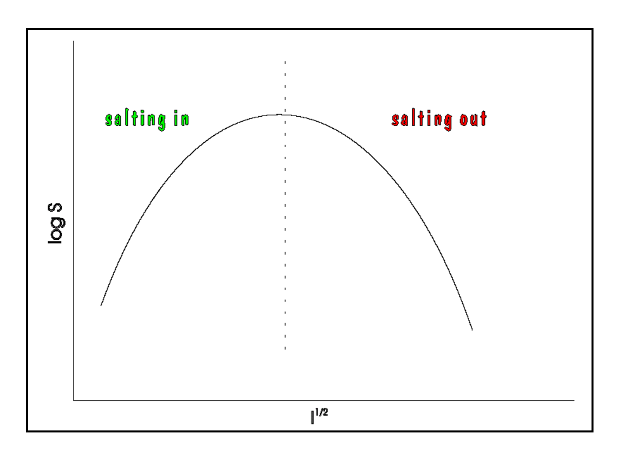


Fig. 3: Variation de la solubilité (S) en fonction de la force ionique (I).

La zone à gauche de la solubilité maximale de la protéine est appelée la zone de « salting-in ». La zone à droite de la solubilité maximale de la protéine est appelée la zone de « salting-out ». Dans la région de « salting-in », la solubilité augmente due à l'élévation de la constante dielétrique du solvant. Ceci entraîne une meilleure interaction entre les charges à la surface de la protéine et l'environnement. Dans la région de « salting-out », la solubilité se réduit car les charges du précipitant entrent en compétition avec les charges superficielles des protéines pour les molécules d'eau, menant à un abaissement de l'état d'hydratation de la protéine.

Les précipitants organiques comme l'éthanol, le méthanol, le propanol, le methy-2,4-pentanediol (MPD) ou l'acetonitrile réduisent la solubilité de la protéine en abaissant la constante diélectrique du solvant. Les polymères organiques fonctionnent de la même façon. C'est par exemple le cas du polyethylenglycol (PEG).





JBS Kit d'initiation à la cristallisation des protéines

Un autre paramètre important affectant la solubilité des protéines est le pH de la solution. En règle générale, la solubilité de la protéine est minimale vers le point isoélectrique car à ce point la charge globale de la protéine est nulle.

Compte tenu du nombre très important de paramètres pouvant influencer la cristallisation et de la quantité réduite de protéines dont les chercheurs disposent habituellement. Il existe des moyens robotises pour tester un grand nombre de conditions en utilisant très peu de protéine (de l'ordre de 0.1 microlitre par expérience).

Caractéristiques des cristaux de protéines

Les cristaux des protéines sont formés de façon similaire aux cristaux de sel. Les mêmes règles d'organisation et de symétrie s'appliquent. Cependant, il existe quelques différences fondamentales au niveau de leurs propriétés mécaniques et optiques et de leurs compositions. Les cristaux de protéines sont plus « mous » et contiennent en général entre 30% et 70% d'eau, dont la plus grande partie est désordonnée dans le cristal.

L'intégrité des cristaux de protéines est maintenue principalement par des interactions existant entre les molécules de protéines. L'espace entre les protéines est
occupé par des molécules d'eau ou de tampon. Par conséquent, les molécules de protéine dans les cristaux existent dans un environnent aqueux quasi naturel. La structure native (le repliement approprié de la molécule de protéine qui lui confère sa fonction et son activité) est conservée. Cela peut être démontré par la réalisation de tests enzymatiques sur la forme cristalline de la protéine. Dans certains cas, la forme cristalline correspond à une forme naturelle de stockage, comme c'est le cas pour l'insuline.

Le kit d'initiation à la cristallisation de Jena Bioscience

Le kit contient tous les matériaux nécessaires à l'exploration de cristallisation d'une protéine, le lysozyme du blanc d'œuf. Il utilise la méthode de la « goutte pendante ». Selon un axe on fait varier le pH et sur l'autre la concentration de précipitant NaCl. L'expérience est réalisée sur une plaque de culture, ce qui permet l'observation directe des effets de ces deux variables sur la nucléation, la morphologie et sur la taille des cristaux. De plus, le kit contient toutes le matériel nécessaire à la cristallisation du lysozyme en utilisant la méthode en « batch ».

Composants du kit :

1. 2 boites pour la cristallisation par la méthode de la « goutte pendante »
2. 1 seringue avec 5 ml de silicone pour seller les lamelles
3. 100 lamelles pour la cristallisation en « goutte pendante »
4. 1 lame pour microscope
5. 20 ml de solution 20% m/v NaCl
6. 3 ml de tampon 1M Na-acétate pH 4,0 ; 4,4 ; 4,8 et 5,2.
7. 200 µl de solution de lysozyme (20mg/ml) dans de l'eau.
8. 1 ml de tampon pour la cristallisation par la méthode en « batch » (30% m/v PEG 5000-MME, 1M NaCl, 50mM Na-acétate pH 4,4).

Éléments nécessaires non inclus dans le kit :

- Micropipettes (pour pipeter des volumes entre 1-500 µl)
- Cônes pour micropipettes
- De l'eau déionisée ou distillée
- Une pièce à température contrôlée (20-22°C)
- Un microscope (grandissement 50-100x) pour observer les cristaux.

Protocole expérimental pour la méthode de la « goutte pendante »

Dans la méthode de la goutte pendante (Fig. 2), le lysozyme cristallise à mesure que la goutte formée par le mélange de la protéine et de la solution de précipitant s'équilibre par rapport à la solution de précipitant du réservoir. Pour cette expérience, nous utiliserons un système Na-acétate/NaCl qui nous permettra de visualiser de quelle façon la





JBS Kit d'initiation à la cristallisation des protéines

cristallisation de la protéine dépend du pH du tampon et de la concentration de NaCl. Une gamme de pH située entre 4,0-5,2 est testée en combinaison d'une variation de concentration de NaCl située entre 4-9%.

L'expérience :

1. Graisser les boites de cristallisation : en utilisant la seringue du kit appliquér le silicone sur la surface supérieur des bords circulaires des réservoirs (puits) de la boite. Le but est de déposer une couche de silicone fine et homogène.
2. Pipeter la solution du réservoir selon le schéma (Fig. 4) : le volume total par réservoir est de 1 ml. La concentration finale de tampon, après le mélange du précipitant et l'eau est de 50 mM. Note : avant de pipeter, s'assurer que la boite de cristallisation est correctement orientée en regardant l'orientation des lignes (A-D) et des colonnes (1-6).

   Constituer la goutte pendante : pipeter 1 µl de la solution de protéine et 1 µl de la solution du réservoir, les mélanger sur une lamelle. Pipeter chaque ligne (A-D) séparément. Déposer d'abord la goutte de solution de protéine sur le centre de la lamelle. Ensuite, en faisant très attention, ajouter 1 µl de la solution du réservoir à chacune des gouttes. Le cône de la micropipette est placé à la surface de la goutte de protéine et le volume de la solution du réservoir est éjecté en évitant la formation de bulles dans la goutte. Le cône de la pipette doit être

3. changé après le dépôt de chaque goutte pour éviter toute contamination.
4. Montage des lamelles : avec des pincettes, inverser chaque lamelle très soigneusement et les placer sur le réservoir correspondant de façon à ce que la goutte soit placée au-dessus du centre du réservoir (voir Fig. 2). Ensuite appliquer une légère pression avec les doigts de façon à ce que le silicone scelle hermétiquement et isole l'intérieur de la chambre du réservoir.

Garder les boites de cristallisation ainsi préparées dans un environnement approprié ayant une température aussi constante que possible (20-22°C). Il est également recommandé de retirer le couvercle de la boite pendant l'observation des gouttes au microscope. Il faut éviter de trop approcher l'objectif de la goutte de façon à ne pas salir l'objectif avec le silicone.

La Figure 5 représente une vue globale des gouttes de cristallisation observées au microscope (grandissement 40X) après 20 heures. Le schéma de numérotation (A-D, 1-6) correspond à la numération de la boite.

Nous pouvons remarquer que le nombre de cristaux augmente, avec l'augmentation de la concentration en NaCl. Un nombre optimal de cristaux est obtenu à une concentration de sel légèrement en dessous de la concentration maximale utilisée. À noter également, le nombre de noyaux formé diminue avec l'augmentation du pH : il y a une diminution du nombre de cristaux avec l'augmentation de pH.

Le protocole pour la méthode « Batch »

La méthode « Batch » requiert une stratégie de pipetage similaire à celle utilisée pour la méthode en « goutte pendante ». De la même façon, une goutte de tampon de cristallisation et une goutte de solution de protéine sont mélangées sur une lamelle. Mais dans la méthode « Batch » la composition du tampon est optimisée de façon à ce que la cristallisation de la protéine ait lieu immédiatement.

Après approximativement 20 minutes, les premiers cristaux peuvent êtres observés au microscope et ils grandissent dans les minutes qui suivent. Les cristaux grandissent relativement vite par cette méthode, en comparaison de la méthode de la « goutte pendante ».

L'expérience :

1. Pipeter la solution tampon : pipeter 4 µl de tampon du « batch » sur la lamelle.
2. Pipeter la solution de protéine : pipeter 2 µl de solution de protéine sur la goutte de tampon.

Observer la goutte au microscope. Le rapport entre les volumes de tampon et de solution de protéine peut





JBS Kit d'initiation à la cristallisation des protéines

varier entraînant ainsi des variations dans la vitesse de formation des cristaux et la quantité de cristaux.

Remerciements

Nous remercions le Dr Manfred Weiss, EMBL Hambourg Outstation pour l'idée originale et pour sa contribution à la production de ce kit. Une grande partie des instructions expérimentales de ce manuel est basée dans les instructions du Dr Weiss .

Traduction :

Version finale/ Révision scientifique :

Jeanne Morinière (PhD Student, EMBL-Grenoble)

Version initiale :

Dr Jean-Baptiste Coutelis (Postdoctoral fellow, EMBL-Heidelberg)

Dr Alexandra Manaia (Science Education Officer, EMBL-Heidelberg)

Data Sheet





JBS Kit d'initiation à la cristallisation des protéines

20 % NaCl

250 mM Acétate de Sodium

concentration finale	4 %	5 %	6 %	7 %	8 %	9 %
50 mM **pH 4.0**	200 µl 600 µl 200µl	250 µl 550 µl 200µl	300 µl 500 µl 200µl	350 µl 450 µl 200µl	400 µl 400 µl 200µl	450 µl 350 µl 200µl
50 mM **pH 4.4**	200 µl 600 µl 200µl	250 µl 550 µl 200µl	300 µl 500 µl 200µl	350 µl 450 µl 200µl	400 µl 400 µl 200µl	450 µl 350 µl 200µl
50 mM **pH 4.8**	200 µl 600 µl 200µl	250 µl 550 µl 200µl	300 µl 500 µl 200µl	350 µl 450 µl 200µl	400 µl 400 µl 200µl	450 µl 350 µl 200µl
50 mM **pH 5.2**	200 µl 600 µl 200µl	250 µl 550 µl 200µl	300 µl 500 µl 200µl	350 µl 450 µl 200µl	400 µl 400 µl 200µl	450 µl 350 µl 200µl

– 20 % NaCl
– 250 mM Na-Acétate
– eau distillée

Fig. 4 : Schéma de pipetage pour l'expérience utilisant la méthode de la goutte pendante





JBS Kit d'initiation à la cristallisation des protéines

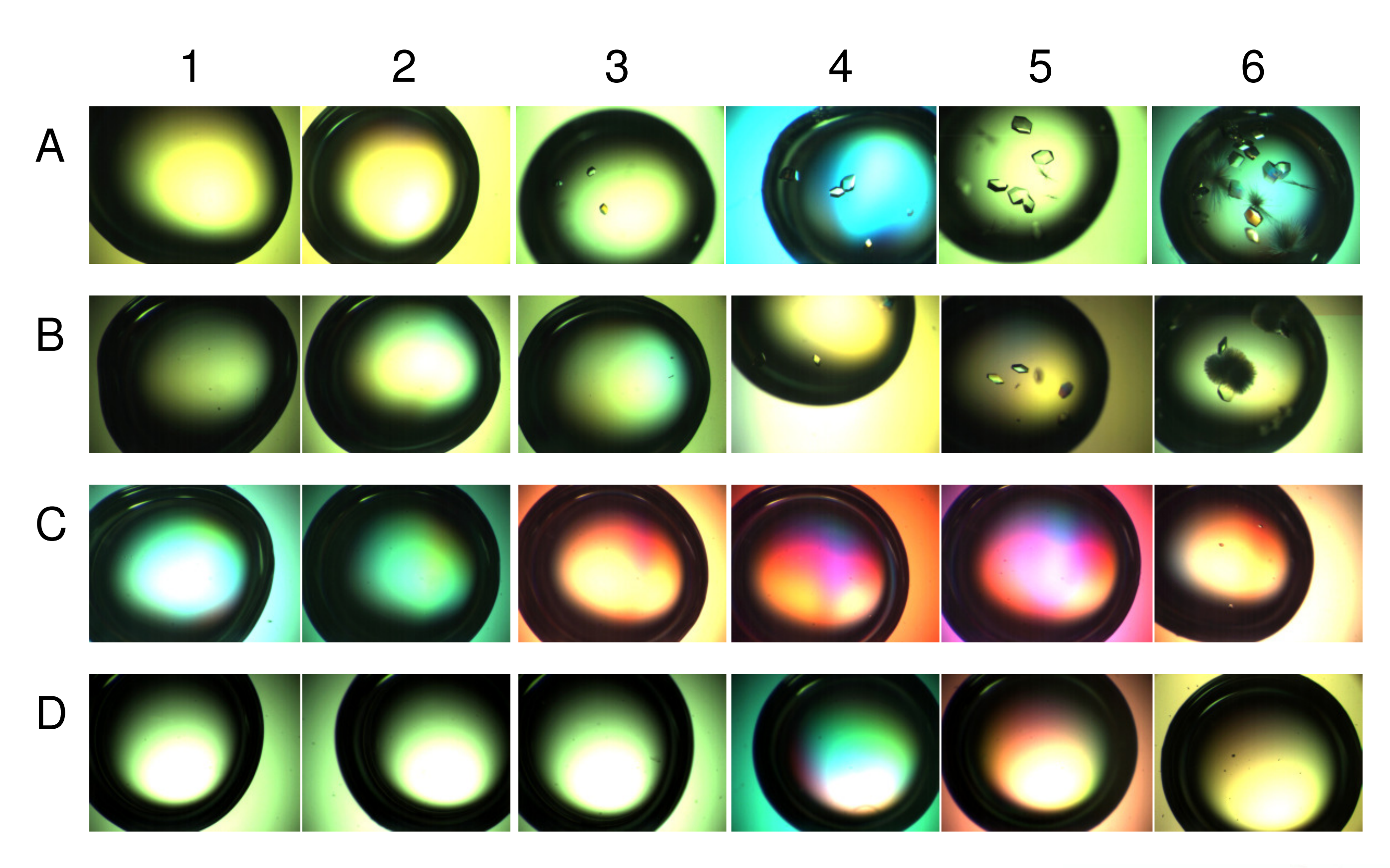


Fig. 5 *Aspect des gouttes pendantes au bout de 20hrs (grandissement 40x)*



211 bis Avenue Kennedy - BP 1140
03103 Montluçon - France
33 (0) 4 70 03 88 55
Fax 33 (0) 4 70 03 82 60
e-mail interchim@interchim.com

Agence Paris - Normandie
33 (0) 1 41 32 34 40
Fax 33 (0) 1 47 91 23 90
e-mail interchim.paris@interchim.com